

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
31 décembre 2014 (31.12.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/207402 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07K 16/28 (2006.01) **G01N 33/68** (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2014/051643

(22) Date de dépôt international :
27 juin 2014 (27.06.2014)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1356356 28 juin 2013 (28.06.2013) FR

(71) Déposants : **GALDERMA RESEARCH & DEVELOPMENT** [FR/FR]; 2400 Route des Colles, Les Templiers, F-06410 Biot (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR). **UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE** [FR/FR]; Jardin du Pharo, 58 boulevard Charles Livon, F-13007 Marseille (FR).

(72) Inventeurs : **CREST, Marcel**; 11 rue de Crémone, F-13006 Marseille (FR). **DELMAS, Patrick**; 15 rue Charles Gounod, F-13127 Vitrolles (FR). **LONIGRO-RAME, Aurélie**; 6 chemin Brise, F-13820 Ensues La Redonne (FR). **OSORIO, Nancy**; Avenue du Ponant, La Castillane, F-83240 Cavalaire Sur Mer (FR).

(74) Mandataires : **VERHAEGHE BECT, Elodie** et al.; Becker & Associates, 25 rue Louis Le Grand, F-75002 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont requises (règle 48.2.h))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : ANTIBODIES AGAINST THE HUMAN SODIUM CHANNEL NAV 1.9 AND USES THEREOF FOR DIAGNOSIS

(54) Titre : ANTICORPS DIRIGÉS CONTRE LE CANAL SODIQUE NAV1.9 HUMAIN ET LEURS UTILISATIONS EN DIAGNOSTIC

(57) Abstract : The invention relates to antibodies against the human sodium channel Nav 1.9 and to the use thereof in the diagnosis of pathologies associated with an enteric or orofacial pain. The invention also relates to a method for producing antibodies against the human Nav 1.9.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet des anticorps dirigés contre le canal sodique Nav1.9 humain et leur utilisation dans le diagnostic de pathologies associées à une douleur entérique ou orofaciale. L'invention concerne également un procédé de préparation d'anticorps dirigés contre Nav 1.9 humain.



WO 2014/207402 A1

**ANTICORPS DIRIGES CONTRE LE CANAL SODIQUE NAV1.9 HUMAIN ET
LEURS UTILISATIONS EN DIAGNOSTIC**

Domaine de l'invention

- 5 L'invention concerne des anticorps dirigés contre le canal sodique Nav 1.9 et leur utilisation dans le diagnostic de pathologies associées à une douleur entérique ou orofaciale.

Contexte de l'invention

- 10 Les canaux sodium voltage-dépendants sont des acteurs essentiels de l'initiation et de la propagation des potentiels d'actions au niveau des cellules dites « excitables ». Ces canaux sodiques sont principalement exprimés au niveau des neurones du système nerveux central et périphérique et au niveau des cellules musculaires. Il s'agit de protéines transmembranaires comprenant une large sous-unité alpha (α) d'environ 260 kDa associée à une ou plusieurs sous-unités bêta de 33 à 38 kDa. La sous-unité alpha forme le cœur du canal et comprend
- 15 quatre domaines membranaires homologues (I-IV), chacun constitué de 6 segments transmembranaires (S1-S6). Les domaines membranaires de la sous unité alpha sont reliés entre eux par de grandes boucles intracellulaires qui comprennent de nombreux sites de régulation. La sous-unité alpha est responsable des propriétés de conductance et de sélectivité du canal alors que les sous-unités bêta sont impliquées dans la stabilisation et dans les
- 20 propriétés cinétiques du canal. A ce jour, 10 isoformes pour la sous-unité alpha ont été identifiées chez l'homme. Le nom attribué à ces isoformes contient le symbole de l'ion transporté (Na), avec en indice l'élément régulateur (le voltage v). Les chiffres qui suivent désignent la sous-famille de gènes et le numéro associé à l'isoforme considérée. A ce jour, la principale sous-famille de gènes identifiée comprend les isoformes Nav1.1 à Nav1.9. Une
- 25 isoforme supplémentaire, plus éloignée, Nax a été également identifiée. Le pourcentage d'identité de séquence entre les différences isoformes Nav1.1 à Nav 1.9 est d'au moins 60%. Les isoformes Nav1.1 à Nav1.9 se différencient, entre autres, par leur sensibilité à la tétrodotoxine (TTX), un bloqueur très puissant et sélectif des canaux sodiques, et par leur distribution tissulaire. Les isoformes Nav1.1 à Nav1.4, Nav1.6 et Nav1.7 sont dites sensibles
- 30 à la TTX avec des EC50 de l'ordre du nanomolaire. Les isoformes Nav1.5, Nav1.8 et Nav1.9 sont considérées, quant à elles, comme résistantes à la TTX. A cet égard, l'EC50 de la TTX pour Nav1.9 est d'environ 200 μ M. En ce qui concerne la distribution tissulaire, les isoformes Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 et Nav1.6 sont principalement exprimées au niveau du système nerveux central. L'isoforme Nav1.4 est exprimée principalement au niveau des myocytes

squelettiques alors que Nav 1.5 est essentiellement présente, chez l'individu adulte, au niveau des myocytes cardiaques. Enfin, les isoformes Nav1.7, Nav1.8 et Nav1.9 sont exprimées au niveau du système nerveux périphérique (SNP). Nav 1.9 a été initialement détecté au niveau des neurones sensitifs des ganglions trijumeaux et des ganglions spinaux. Des expériences d'invalidation du gène de Nav 1.9 ont confirmé l'implication de ce canal sodique dans la nociception, en particulier dans l'hyperexcitabilité des nocicepteurs et l'hyperalgie associée à l'inflammation. Plus récemment, Padilla *et al.* (Molecular and Cellular Neuroscience, 2007; 35(1):138-52) ont mis en évidence, chez le rat, que Nav 1.9 est exprimé au niveau des terminaisons nerveuses du nerf trijumeau, et au niveau des neurones sensitifs afférents du plexus myentérique et sous-muqueux du duodénum. Cette distribution tissulaire suggère que Nav 1.9 pourrait être impliqué dans la perception des douleurs orofaciales et dans certains troubles intestinaux. Enfin, Lolignier *et al.* (PlosOne, 2011, e23083) ont montré une surexpression de Nav 1.9 au niveau des fibres nerveuses innervant un foyer inflammatoire chez un modèle murin d'inflammation aigüe. Ces auteurs ont également montré, grâce à des modèles murins, que Nav 1.9 est impliqué dans l'hypersensibilité à la douleur mécanique et thermique associée aux inflammations subaiguë et chronique.

Néanmoins, l'implication de Nav 1.9 dans les pathologies humaines reste encore à explorer. A la connaissance des demandeurs, aucun anticorps ciblant spécifiquement Nav 1.9 humain (hNav 1.9) et utilisable pour la détection et la quantification de cette protéine dans des tissus humains n'a été décrit à ce jour. Il existe donc à l'heure actuelle un besoin de nouveaux outils biochimiques de détection et de quantification tissulaire de hNav 1.9.

Résumé de l'invention

L'invention a pour objet un anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain caractérisé en ce que ledit anticorps se lie à un épitope inclus dans un peptide de séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3. L'anticorps selon l'invention est adapté à une utilisation pour la détection ou la quantification de Nav 1.9 dans un échantillon biologique, de préférence tissulaire. L'anticorps selon l'invention peut être un anticorps polyclonal, de préférence d'isotype IgG ou IgM, ou un anticorps monoclonal. L'anticorps peut être chimérique ou humanisé. Il peut être choisi parmi une immunoglobuline comprenant 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères, un anticorps à simple domaine (sdab), ou une IgNar, un polypeptide comprenant un domaine variable d'un anticorps tel qu'un ScFv, un VH, un V_HH, un V_{NAR}, un Fab, et les versions chimériques ou humanisés de ceux-ci.

Dans certains modes de réalisation, l'anticorps selon l'invention ne se lie pas à Nav 1.5 et Nav 1.7, de préférence humain. Dans un mode de réalisation supplémentaire, l'anticorps selon l'invention est obtenu à partir d'anticorps, ou de cellules exprimant des anticorps, provenant d'un animal non-humain immunisé avec un composé antigénique comprenant au moins un peptide ayant au moins 90% d'identité de séquence avec SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3. Dans certains modes de réalisation, le composé antigénique comprend au moins un peptide de SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3 ou un peptide ayant une séquence qui diffère de SEQ ID N°1, N°2 ou N°3 en vertu d'une, de deux, ou de trois modifications d'acide aminé.

L'anticorps selon l'invention peut être couplé à un moyen de détection, de préférence choisi parmi une enzyme produisant un signal détectable telle que la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la 3-galactosidase, ou la glucose-6-phosphate déshydrogénase, un chromophore, un composé fluorescent, un composé luminescent, un radionucléide tel que ^{32}P , ^{35}S ou ^{125}I , une particule métallique, par exemple une nanoparticule d'or, une biotine, une streptavidine, une avidine, un sucre ou une lectine.

Un objet supplémentaire de l'invention est une méthode de préparation d'un anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain comprenant une étape d'immunisation d'un animal non-humain avec un composé antigénique comprenant au moins un peptide ayant au moins 90% d'identité de séquence avec SEQ ID N°1, de SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3. Dans certains modes de réalisation, le composé antigénique comprend au moins un peptide de SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3 ou un peptide ayant une séquence qui diffère de SEQ ID N°1, N°2 ou N°3 en vertu d'une, de deux, ou de trois modifications d'acide aminé. Le composé antigénique peut en outre comprendre une protéine porteuse couplée à une ou plusieurs copies dudit peptide.

Dans certains modes de réalisation, la méthode de préparation selon l'invention peut comprendre, en outre, la récupération de l'anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain à partir du plasma sanguin de l'animal non-humain, après immunisation.

Dans d'autres modes de réalisation, la méthode de préparation selon l'invention peut comprendre, la production de l'anticorps dirigé contre Nav 1.9 par un hybridome obtenu à partir d'une cellule exprimant des anticorps, de préférence un lymphocyte B, provenant de l'animal non-humain, après immunisation.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un anticorps tel que décrit précédemment pour la détection ou la quantification de Nav 1.9 dans un échantillon biologique humain. L'échantillon biologique peut être un résidu chirurgical, une biopsie ou un prélèvement post-

mortem. Un objet supplémentaire de l'invention est l'utilisation dudit anticorps pour le diagnostic, le pronostic et/ou la prédiction *in vitro* d'une pathologie, de préférence à caractère inflammatoire, associée à une douleur entérique ou à une douleur orofaciale. Les pathologies associées à une douleur entérique comprennent, entre autres, le syndrome de l'intestin irritable, les maladies inflammatoires chroniques intestinales telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Les pathologies provoquant une douleur orofaciale comprennent, entre autres, une hypersensibilité dentaire (dents sensibles), une pulpite, une odontalgie, une douleur des muscles maxillaires ou des articulations temporo-mandibulaires, une névralgie, de préférence idiopathique, du nerf trijumeau, une céphalée et une brûlure idiopathique de la langue et de la bouche.

Dans des modes de réalisations préférés, l'anticorps dirigé contre Nav 1.9 selon l'invention est utilisé pour détecter ou quantifier Nav 1.9 dans un échantillon tissulaire humain comprenant un ganglion et/ou une fibre nerveuse sensitive du tube intestinal ou d'une zone orofaciale. L'échantillon tissulaire peut être ainsi choisi parmi un échantillon de pulpe dentaire, un échantillon de ganglions myentériques, un échantillon de ganglions du plexus sous-muqueux, un échantillon comprenant des fibres nerveuses du plexus myentérique ou sous-muqueux. La détection ou la quantification de Nav 1.9 par l'anticorps selon l'invention peut être réalisée par western blot, par immunodosage ou par immunomarquage. Une méthode de détection ou de quantification de Nav 1.9 particulièrement préférée est l'immunohistochimie.

Enfin, la présente invention a également pour objet un kit, ou l'utilisation d'un kit, pour le diagnostic d'une pathologie associée à une douleur viscérale ou à une douleur orofaciale, comprenant au moins un anticorps dirigé contre Nav 1.9 selon l'invention et en option un moyen de détection dudit anticorps.

Figures

La **Figure 1** montre les résultats d'immunomarquage de cellules HEK après fixation au PAF (paraformaldéhyde) 2% par un anticorps monoclonal anti-Myc et l'anticorps anti-hNav 1.9 Rbaa4. **Figure 1a** : cellules transfectées avec phNav1.9-myc. **Figure1b** : cellules non transfectées.

La **Figure 2** montre les résultats d'immunomarquage avec l'anticorps Rbaa4 des cellules co-transfectées avec hNav 1.5 et un plasmide codant pour la GFP (Figure 2A) ou hNav 1.7 et un plasmide codant pour la GFP (Figure 2B). Alors que le signal émis par la GFP est clairement visible, le marquage avec Rbaa4 des cellules est très faible voire inexistant.

La **Figure 3** montre les western blot réalisés sur des extraits protéiques de cellules HEK non transfectées ou transfectées avec un plasmide codant pour hNav 1.9-myc. NT : lysat de cellules non-transfectées (témoin négatif), T : lysat de cellules transfectées. Les anticorps Rbaa4 et Rbaa6 reconnaissent une bande protéique

- 5 d'un poids moléculaire d'environ 250 kDa qui n'est pas détectée pour les cellules non transfectées. Cette bande est bien reconnue par l'anticorps anti-Myc.

La **Figures 4** montre l'immunomarquage d'une coupe transverse de côlon chimiquement fixée au paraformaldéhyde. De haut en bas : marquage avec un anticorps anti HuC/D, marquage avec l'anticorps Rbaa4, comarquage HuC/D et Nav 1.9. * : neurones
10 immunopositifs pour Nav 1.9, ° : neurones immunonégatifs pour Nav 1.9.

La **Figures 5** montre l'immunomarquage d'une coupe transverse de côlon chimiquement fixée au paraformaldéhyde par un anticorps anti-HuC/D (figure 5A) et par l'anticorps Rbaa6 (Figure 5B). Le résultat de co-marquage est montré à la figure 5C. * : neurones immunopositifs pour Nav 1.9, ° : neurones immunonégatifs pour Nav 1.9.

- 15 La **Figure 6** montre l'immunomarquage d'une coupe transverse de côlon cryofixée. De haut en bas : marquage avec un anticorps anti-NF200, marquage avec l'anticorps 3881.1, comarquage. * : neurones immunopositifs pour Nav 1.9, ° : neurones immunonégatifs pour Nav 1.9.

La **Figure 7** montre l'immunomarquage d'un échantillon de pulpe dentaire radiculaire fixée
20 au paraformaldéhyde par un anticorps anti-périphérine (Figure 7A) et par l'anticorps Rbaa4 (Figure 7B). Le résultat de co-marquage est montré à la figure 7C.

La **Figure 8** montre l'immunomarquage d'un échantillon de pulpe dentaire radiculaire fixée au paraformaldéhyde par un anticorps anti-périphérine (Figure 8A) et par l'anticorps Rbaa6 (Figure 8B). Le résultat de co-marquage est montré à la figure 8C.

- 25 La **Figure 9** montre l'immunomarquage d'un échantillon de plexus sub-odonblastique (pulpe dentaire coronaire) cryofixée par un anticorps anti-périphérine (Figure 9A) et par l'anticorps 3881.1 (Figure 9B). Le résultat de co-marquage est montré à la figure 9C.

La **Figure 10** montre l'immunomarquage d'un échantillon de pulpe dentaire radiculaire cryofixée par un anticorps anti-périphérine (Figure 10A) et par l'anticorps 3881.1 (Figure
30 10B). Le résultat de co-marquage est montré à la figure 10C.

La **Figure 11** montre l'immunomarquage d'un échantillon de ganglion trijumeau (prélèvement post-mortem) cryofixé par un anticorps anti-NF200 (Figure 11A) et par l'anticorps Rbaa6 (Figure 11B). Le résultat de co-marquage est montré à la figure 11C.

Description détaillée de l'invention

Les Demandeurs ont préparé trois anticorps polyclonaux – dénommés ci-après Rbaa4, 3881-1 et Rbaa6 - dirigés contre Nav 1.9 humain. Ces anticorps ont été obtenus par immunisation d'un animal non-humain (lapin) avec un composé antigénique comprenant un peptide de séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3. Le peptide de séquence SEQ ID N°1 correspond à un fragment de la partie N-terminale de Nav 1.9 humain (hNav 1.9) alors que les peptides de séquence SEQ N°2 et SEQ ID N°3 sont des fragments provenant des boucles intracellulaires reliant les domaines transmembranaires I-II et II-III de hNav 1.9, respectivement. Les Demandeurs ont mis en évidence que ces anticorps polyclonaux sont capables de détecter *in vitro* la présence de Nav 1.9 et ceci de manière spécifique. Grâce à ces anticorps, les Demandeurs ont montré que hNav1.9 est exprimé au niveau des fibres sensitives non-myélinisées de la pulpe dentaire et du plexus myentérique provenant d'échantillons humains. Ces résultats suggèrent fortement une implication de Nav 1.9 dans des pathologies associées à une douleur entérique ou orofaciale. Par ailleurs, les Demandeurs ont également montré que le canal sodique Nav 1.9 est impliqué dans les mécanismes de relargage de peptides pro-inflammatoires par les neurones sensitifs, consécutivement à leur stimulation. Nav 1.9 serait donc également impliquée dans la potentialisation des réponses inflammatoires neurogènes. Ainsi, la présente invention concerne des anticorps dirigés contre Nav 1.9 humain, et leur procédé de préparation. L'invention concerne également l'utilisation de ces anticorps dans le diagnostic de pathologies associées à une douleur orofaciale ou entérique, de préférence à caractère inflammatoire.

▪ Anticorps dirigés contre Nav 1.9

Selon un premier aspect, l'invention concerne un anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain (également désigné ici hNav 1.9 et Nav 1.9). Cet anticorps est caractérisé en ce qu'il est capable de se lier à un épitope inclus dans un peptide de séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3.

On entend par « Nav 1.9 » ou « hNav1.9 » la sous-unité alpha humaine Nav 1.9 constitutifs de certains canaux sodiques dépendants du potentiel (ou voltage-dépendants) humains. La sous-unité alpha Nav 1.9 est codée par le gène SCN11A qui est également dénommé NaN, SCN12A et SNS-2 dans la littérature. Le numéro d'identifiant du gène Nav 1.9 humain dans la base de gènes du NCBI est 11289 (NCBI Gene ID). La séquence protéique de Nav 1.9 humain est notamment décrite dans la base de séquences UniProt (Référence de séquence :

Q9UI33) et celle du NCBI (référence de séquence NCBI : NP_054858). En ce qui concerne l'ARNm pour Nav 1.9, voire la séquence de référence NCBI : NM_014139.

Le peptide de séquence SEQ ID N°1 correspond à un fragment de la partie N-terminale de hNav 1.9 (acides aminés de la position 31 à 47 de hNav1.9) alors que les peptides de séquence SEQ N°2 et SEQ ID N°3 sont des fragments provenant des boucles intracellulaire reliant les domaines membranaires I-II et II-III de hNav 1.9, respectivement. Plus précisément, le peptide de SEQ ID N°2 correspond au fragment allant de l'acide aminé 473 à l'acide aminé 488 de la séquence de hNav1.9 et le peptide de SEQ ID N°3 correspond au fragment allant de l'acide aminé 945 à l'acide aminé 961 de la séquence de Nav 1.9.

On entend par « anticorps anti-Nav 1.9 » ou par « anticorps dirigé contre Nav 1.9 » tout anticorps ou tout polypeptide comprenant un fragment d'anticorps capable de reconnaître et de se lier spécifiquement à un épitope de la sous-unité alpha Nav 1.9 humain, ledit épitope ayant de préférence une séquence en acides aminés incluse dans SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3. Nav 1.9 peut être associé à d'autres protéines, par exemple à une sous-unité beta, et/ou exprimé au niveau d'une membrane cellulaire. Dans certains modes de réalisation, les anticorps selon l'invention peuvent se lier à Nav 1.9 présent sous une forme isolée (par exemple sous une forme pré-purifiée, purifiée et/ou non-enchâssée dans une membrane cellulaire). Dans d'autres modes de réalisations les anticorps selon l'invention sont capables de reconnaître Nav 1.9 exprimé au niveau d'une membrane cellulaire et/ou sous la forme de vésicules cytoplasmiques

Les Demandeurs ont montré que les anticorps selon l'invention sont particulièrement adaptés à une utilisation pour la détection ou la quantification de Nav 1.9 dans un échantillon biologique, de préférence un échantillon tissulaire. Les anticorps selon l'invention peuvent être utilisés pour détecter ou quantifier Nav 1.9 par des techniques d'immunomarquage, et/ou d'immunodosage et/ou par western blot. Les anticorps selon l'invention sont particulièrement adaptés à une utilisation dans la détection ou la quantification de Nav1.9 par immunohistochimie. Il va de soi que les échantillons sont des échantillons biologiques humains c'est-à-dire des échantillons qui sont préalablement collectés ou prélevés sur un être humain. Les échantillons biologiques préférés selon l'invention sont décrits en détail ci-après.

Sans vouloir être lié par une quelconque théorie, les Demandeurs sont d'avis que les propriétés de détection des anticorps selon l'invention résultent des épitopes spécifiques de Nav 1.9 contre lesquels les anticorps sont dirigés. En effet, les Demandeurs ont montré que des anticorps dirigés contre d'autres régions de Nav 1.9 - par exemple contre le peptide de

SEQ ID N°4 de la boucle intracellulaire liant les domaines membranaires II-III de Nav 1.9 - présentent soit une sensibilité trop faible (c'est-à-dire une affinité trop faible pour Nav 1.9) et/ou une spécificité trop faible pour être utilisés pour la détection ou la quantification tissulaire de Nav 1.9.

- 5 Dans certains modes de réalisations, l'anticorps selon l'invention a été obtenu à partir d'un anticorps, de préférence plasmatique, ou d'une cellule exprimant des anticorps, ledit anticorps ou ladite cellule provenant d'un animal non-humain immunisé avec un composé antigénique comprenant au moins un peptide ayant au moins 90% d'identité de séquence avec SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3. Dans certains modes de réalisation, le composé
- 10 antigénique comprend au moins un peptide de SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3 ou un peptide ayant une séquence qui diffère de SEQ ID N°1, N°2 ou N°3 en vertu d'une, de deux, ou de trois modifications d'acide aminé.

De préférence, le composé antigénique comprend au moins un peptide de séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3. On entend par « composé antigénique » un composé dont

15 l'administration à un animal non-humain, seule ou en combinaison avec un immunoadjuvant, est capable d'induire une réaction immunitaire humorale. Dans un mode de réalisation préféré, le composé antigénique comprend plusieurs copies dudit peptide ou desdits peptides ci-dessus décrits, éventuellement couplées entre elles. Dans certains modes de réalisation, le composé antigénique comprend une protéine porteuse sur laquelle est greffée une ou plusieurs

20 copies d'un peptide ou de plusieurs peptides tels que définis précédemment.

Des méthodes pour obtenir un anticorps selon l'invention sont décrites en détails ci-après.

Comme mentionné ci-avant, un anticorps selon l'invention peut être tout anticorps ou polypeptide comprenant un fragment d'anticorps capable de reconnaître et de se lier spécifiquement à Nav 1.9 humain, de préférence à un épitope inclus dans une région de Nav

25 1.9 de séquence choisie parmi SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 et SEQ ID N°3. L'anticorps selon l'invention peut être un anticorps monoclonal ou polyclonal. On entend, par « anticorps polyclonaux » ou « anticorps polyclonal », un mélange d'anticorps dirigés contre plusieurs épitopes. On entend par « anticorps monoclonal » ou « anticorps monoclonaux », un anticorps ou un ensemble d'anticorps qui reconnaisse un même et unique épitope.

30 L'anticorps selon l'invention peut être un anticorps humanisé ou chimérique. Dans certains modes de réalisations, il est préparé par un procédé incluant une étape d'immunisation d'un animal non-humain. A titre alternatif, il peut être préparé par des techniques de génie génétique.

Dans certains modes de réalisation, l'anticorps est une immunoglobuline « entière » c'est-à-dire qu'il a la structure d'une immunoglobuline présente naturellement dans un plasma sanguin. Il peut s'agir d'une immunoglobuline comportant 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères, par exemple une immunoglobuline d'isotype G, ou d'un anticorps à chaîne lourde, c'est-à-dire constitué de 2 chaînes lourdes et dépourvu de chaînes légères tel qu'un anticorps à chaîne lourde d'un camélidé (HcAb) ou une IgNAR d'un poisson cartilagineux.

Dans d'autres modes de réalisation, l'anticorps selon l'invention est un polypeptide comprenant un fragment d'une immunoglobuline, de préférence un domaine variable capable de se lier à Nav 1.9, en particulier à un épitope inclus dans un peptide de séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 et SEQ ID N°3. L'anticorps selon l'invention peut être choisi parmi un ScFv, un VH, un V_HH (également appelé anticorps à simple domaine), un V_{NAR}, un Fab, ou un Fab2, les versions chimériques et humanisés de ceux-ci et les polypeptides les comprenant. A titre d'exemple, l'anticorps selon l'invention peut être une protéine de fusion comprenant un domaine ScFv humanisé fusionné avec les domaines CH3-CH2 du domaine Fc d'une IgG humaine.

Dans un mode de réalisation préféré, l'anticorps selon l'invention est un anticorps polyclonal. Dans un mode de réalisation supplémentaire, l'anticorps est spécifique de Nav 1.9, en particulier par rapport à Nav 1.5 et/ou Nav 1.7. Ceci signifie que l'affinité de l'anticorps selon l'invention pour Nav 1.9 est supérieure à celle observée pour une autre protéine, en particulier Nav 1.5 et/ou Nav 1.7.

La spécificité de l'anticorps selon l'invention pour Nav 1.9 peut être déterminée par toute méthode connue de l'homme du métier. Lorsque l'anticorps selon l'invention est monoclonal, on peut comparer par exemple sa constante de dissociation (K_d) pour Nav 1.9 par rapport à son éventuel K_d pour l'autre protéine. Les constantes de dissociation peuvent être déterminées par toute méthode adaptée, y compris par résonance plasmonique de surface. On peut considérer que l'anticorps selon l'invention est spécifique de Nav 1.9 par rapport à une autre protéine si sa constante de dissociation pour Nav 1.9 est au moins 10 fois inférieure, de préférence au moins 100 voire au moins 1000 fois inférieure, à celle observée pour l'autre protéine.

De manière générale, le K_d d'un anticorps monoclonal selon l'invention est généralement inférieur à 10⁻⁶, de préférence 10⁻⁹ M.

Lorsque l'anticorps selon l'invention est polyclonal, on peut évaluer sa spécificité vis-à-vis de Nav 1.9 et d'une autre protéine par immunomarquage, comme cela est illustré dans les exemples. A cette fin, on effectue un immunomarquage avec l'anticorps selon l'invention

d'une première culture cellulaire exprimant de manière recombinante le Nav 1.9 humain, et d'une seconde culture cellulaire exprimant de manière recombinante l'autre protéine.

On considère que l'anticorps est spécifique de Nav 1.9 par rapport à l'autre protéine si le marquage obtenu pour la première culture cellulaire exprimant Nav 1.9 est plus important (d'au moins 20%, de préférence d'au moins 50% en intensité et/ou en surface) par rapport à celui obtenu pour la seconde culture cellulaire. A titre alternatif, la spécificité d'un anticorps peut être évaluée grâce à des expériences de western blot effectuées sur des extraits protéiques provenant des systèmes cellulaires ci-dessus mentionnés.

Dans certains modes de réalisation, l'anticorps selon l'invention ne lie pas Nav 1.5 et/ou Nav.1.7. En d'autres termes, le rapport de sa constante de dissociation pour Nav 1.9 sur celle de Nav1.5 et/ou Nav1.7 est au plus égale à 10^{-3} , de préférence 10^{-4} et/ou le marquage avec l'anticorps selon l'invention d'une culture cellulaire exprimant Nav 1.5 et/ou Nav 1.7 (sans exprimer Nav 1.9) est faible, voire inexistant, en comparaison avec le marquage obtenu pour une lignée cellulaire identique exprimant Nav 1.9 (sans exprimer Nav 1.5 ou Nav 1.7).

Dans d'autres modes de réalisation l'anticorps selon l'invention ne présente pas une réactivité croisée vis-à-vis d'une protéine homologue à Nav 1.9 humain. Par exemple, l'anticorps selon l'invention ne lie pas Nav 1.9 de rat, de lapin ou de souris.

Dans un mode de réalisation supplémentaire, l'anticorps selon l'invention ne présente pas de réactivité croisée vis-à-vis de hNav 1.8, et/ou hNav 1.7 et/ou hNav 1.5, et/ou des Nav 1.9 non-humains.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps dirigé contre Nav 1.9 est couplé à un moyen permettant sa détection. Le moyen de détection peut être tout moyen connu par l'homme du métier. Il peut s'agir d'une enzyme produisant un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence, luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la 3-galactosidase, ou la glucose-6-phosphate déshydrogénase. A titre alternatif, l'anticorps peut être couplé à un chromophore, par exemple, un composé fluorescent, luminescent ou colorant. A titre d'exemple de molécules fluorescentes, on peut citer les Alexa ou les phycocyanines. Le moyen de détection peut être également choisi parmi les radionucléides tels que ^{32}P , ^{35}S ou le ^{125}I , les particules métalliques, par exemple, les nanoparticules d'or ou encore les quantum dots. La détection de l'anticorps peut être également effectuée grâce à un système de reconnaissance de type biotine/streptavidine ou avidine ou encore sucre/lectine. Dans ce cas, l'anticorps peut être, par exemple, couplé à la biotine et la détection se fait grâce à la streptavidine ou l'avidine elle-même marquée par un moyen de détection tels que ceux précédemment cités.

Dans d'autres modes de réalisation, l'anticorps selon l'invention n'est pas couplé à un moyen de détection. Dans ce cas, l'anticorps selon l'invention peut être détecté de manière indirecte en utilisant un anticorps de détection (également appelé anticorps secondaire) lui-même couplé à un moyen de détection comme décrit précédemment. L'anticorps de détection peut être par exemple dirigé contre la partie Fc de l'anticorps selon l'invention.

▪ Méthode de préparation d'un anticorps selon l'invention

Un objet supplémentaire selon l'invention est une méthode de préparation d'un anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain. Cette méthode peut comprendre une étape d'immunisation d'un animal non-humain avec un composé antigénique comprenant un peptide ayant au moins 80%, de préférence 90% d'identité de séquence avec SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3. Dans certains modes de réalisation, la méthode de préparation d'un anticorps dirigé contre Nav 1.9 comprend une étape d'immunisation d'un animal non-humain avec un composé antigénique comprenant un peptide de SEQ ID N°1, N°2 ou N°3, ou comprenant un peptide dont la séquence diffère d'une séquence choisie parmi SEQ ID N°1, 2 et 3 en vertu d'une, deux ou trois modifications d'acide aminé.

Au sens de l'invention, une modification d'acide aminé englobe le remplacement (ou la substitution) d'un acide aminé par un autre acide aminé, la délétion d'un acide aminé ou l'insertion d'un acide aminé.

De préférence, la ou les modifications d'acide aminé sont des substitutions conservatives.

L'animal non-humain peut être tout animal utilisé pour générer des anticorps en laboratoire ou dans l'industrie pharmaceutique. Il peut s'agir, par exemple, d'une souris, d'un rat, une chèvre ou d'un lapin. Pour obtenir un anticorps à chaîne lourde, l'animal non-humain est choisi parmi un camélidé ou un poisson cartilagineux.

De préférence, le composé antigénique comprend au moins un peptide de séquence choisie parmi SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 et SEQ ID N°3.

Dans certains modes de réalisation, le composé antigénique peut comprendre plusieurs peptides, par exemple un peptide de séquence SEQ ID N°1 et un peptide de séquence SEQ ID N°2, ou un peptide de SEQ ID N°2 et un peptide de SEQ ID N°3, ou encore un peptide de SEQ ID N°1 et un peptide de SEQ ID N°3.

Dans certains modes de réalisation, le composé antigénique comprend une protéine porteuse couplée à une ou plusieurs copies dudit peptide ou desdits peptides. La protéine porteuse peut être choisie par exemple parmi la KLH (Keyhole limpet hemocyanin), une albumine sérique, une ovalbumine, une poly-L-lysine ou un toxoïde, par exemple le toxoïde tétanique. L'étape

d'immunisation de l'animal non-humain comprend l'administration à l'animal non-humain du composé antigénique, seul ou en combinaison avec un immunoadjuvant. L'immuno-adjuvant peut être tout immunoadjuvant classiquement utilisé en recherche, par exemple, l'adjuvant de Freund, une huile minérale comme le specol, un squalène ou un sel d'aluminium.

- 5 L'administration du composé antigénique peut être faite par toute voie, de préférence par voie sous-cutanée, intramusculaire ou intra-péritonéale. La dose du composé antigénique varie selon l'animal-non humain à immuniser et est comprise généralement entre 10 µg et 10 mg. L'administration du composé antigénique peut être renouvelée plusieurs fois, par exemple 2, 3, 4, 5, 6 fois jusqu'à obtenir une réponse immunitaire humorale satisfaisante.
- 10 Chaque administration peut être espacée d'un ou plusieurs jours, typiquement de 7 à 30 jours. Les étapes de la méthode de préparation selon l'invention varient selon que l'on souhaite obtenir un anticorps monoclonal, polyclonal ou encore un anticorps chimérique ou humanisé. Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus à partir de cellules productrices d'anticorps, par exemple des lymphocytes B, prélevées après immunisation de l'animal non-humain. Dans
- 15 ce cas, on utilise la technique classique de préparation d'hybridomes bien connue de l'homme du métier.

- Un anticorps polyclonal peut être obtenu à partir du plasma sanguin de l'animal non-humain, prélevé après immunisation, en mettant en œuvre des étapes classiques de purification comme des étapes de centrifugation, de précipitation et de chromatographies d'affinité, en particulier
- 20 en utilisant comme ligand d'affinité le peptide dérivé de Nav 1.9 présent dans le composé antigénique utilisé pour immuniser l'animal non-humain ou la protéine hNav 1.9 elle-même. On préfère utiliser une chromatographie d'affinité dans laquelle le ligand d'affinité est choisi parmi le groupe constitué par le peptide de séquence SEQ ID N°1, le peptide de séquence SEQ ID n°2 et le peptide de séquence SEQ ID N°3.

- 25 Selon un aspect supplémentaire, l'invention a également pour objet une méthode de sélection d'un anticorps dirigé contre hNav 1.9 adapté à une utilisation pour la détection ou la quantification de hNav 1.9 dans un échantillon biologique, de préférence un échantillon tissulaire, par exemple un échantillon de peau, ladite méthode de sélection comprenant les étapes consistant à :

- 30 (a) fournir un ou plusieurs anticorps susceptibles d'être dirigé contre hNav 1.9,
- (b) mettre en contact le ou les anticorps fournis à l'étape (a) avec un peptide ayant au moins 90%, de préférence 100%, d'identité de séquence avec SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3, ledit peptide étant de préférence immobilisé sur un support, et
- (c) sélectionner le ou les anticorps ayant formé un complexe avec le peptide à l'étape (b).

Le ou les anticorps de l'étape (a) peuvent être fournis sous la forme d'une solution comprenant un mélange d'anticorps, par exemple une solution dérivant d'un plasma sanguin, sous une forme isolée (purifiée ou pré-purifiée), chaque anticorps étant testé séparément, ou encore sous la forme d'une librairie d'anticorps exprimée à la surface de phages ou de cellules.

Il va de soi que la présente invention concerne également un anticorps dirigé contre Nav 1.9 obtenu ou susceptible d'être obtenu par l'une des méthodes de préparation ci-dessus décrites.

▪ Utilisations de l'anticorps selon l'invention

Comme mentionné précédemment, les anticorps selon l'invention sont particulièrement adaptés pour une utilisation pour la détection et/ou la quantification de Nav 1.9 dans des échantillons biologiques, en particulier des échantillons tissulaires humains. Les anticorps selon l'invention sont donc utilisables en tant qu'outil diagnostique. Ces anticorps trouvent des applications, entre autres, en anapathologie, en médecine légale et en recherche médicale.

Sans vouloir être lié par une quelconque théorie, les Demandeurs sont également d'avis qu'une surexpression de Nav 1.9 au niveau des neurones sensitifs, en particulier au niveau des terminaisons nerveuses, est impliquée dans la pathogénèse de certaines pathologies se caractérisant par des douleurs aiguës. A cet égard, les Demandeurs ont mis en évidence l'expression de hNav 1.9 au niveau des corps cellulaires des neurones du ganglion trijumeau mais également au niveau des fibres nerveuses sensitives de la pulpe dentaire, à partir d'échantillons humains de dents de sagesse. hNav 1.9 peut donc être considéré comme un marqueur pour le diagnostic de pathologies associée à une douleur orofaciale.

Les Demandeurs ont également montré que Nav 1.9 est exprimé au niveau des ganglions du plexus myentérique (également appelé plexus d'Auerbach) présent dans des résidus chirurgicaux sains de côlon de patients atteints de cancer. Les Demandeurs sont également d'avis que Nav 1.9 est exprimé au niveau du plexus sous-muqueux (également appelé plexus de Meissner). De manière plus générale, les Demandeurs sont d'avis que hNav1.9 est également un marqueur pour le diagnostic de certaines pathologies touchant l'appareil gastro-intestinal et se caractérisant par des douleurs entériques ou un inconfort abdominal.

Ainsi, un objet supplémentaire selon l'invention est l'utilisation d'un anticorps tel que décrit précédemment pour la détection ou la quantification de Nav 1.9 dans un échantillon biologique humain, de préférence un échantillon tissulaire.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un anticorps selon l'invention pour le diagnostic, le pronostic et/ou la prédiction d'une pathologie associée à une douleur entérique ou à une douleur orofaciale. Dans certains modes de réalisation, la pathologie est une pathologie inflammatoire. En d'autres termes, une pathologie selon l'invention peut être une

5 maladie (ou un désordre) associée, causée ou impliquant une réaction inflammatoire.

Au sens de l'invention, on entend par « diagnostic » une méthode permettant de déterminer si un individu est effectivement atteint par une pathologie associée à une douleur entérique ou à une douleur orofaciale. On entend par « pronostic » une méthode permettant d'évaluer l'évolution d'une pathologie associée à une douleur entérique ou à une douleur orofaciale

10 chez un patient qui en est atteint, éventuellement en présence d'un traitement thérapeutique. On entend par « prédiction » une méthode permettant d'évaluer si un individu est susceptible de développer ladite pathologie associée à une douleur entérique ou une douleur orofaciale.

Au sens de l'invention, on entend par « une pathologie associée à une douleur entérique » une maladie ou un désordre dont un des symptômes possibles est une douleur entérique. Les

15 patients atteints par une pathologie associée à une douleur entérique englobe les patients atteints par ladite pathologie et souffrant effectivement d'une douleur entérique ainsi que les patients atteints par ladite pathologie mais qui ne présentent pas, ou qui n'ont pas encore développé, une douleur entérique. Une douleur entérique fait référence à une douleur touchant, ou trouvant son origine, dans un tissu ou un organe de l'appareil digestif. Il peut

20 s'agir d'une douleur œsophagienne, d'une douleur gastrique, d'une douleur épigastrique, d'une douleur intestinale ou d'une douleur rectale. De préférence, il s'agit d'une pathologie affectant l'intestin grêle, et/ou le côlon et/ou le rectum. A titre d'exemple, il peut s'agir d'un syndrome de l'intestin irritable ou d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin. Les principales maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont la maladie de Crohn et la

25 colite ulcéreuse (également appelé rectocolite hémorragique). Ces pathologies englobent également la pochite et les colites dites microscopiques telles que les colites collagénique et lymphocytaire.

Au sens de l'invention, on entend par « pathologie associée à une douleur orofaciale » une maladie ou un désordre dont un des symptômes possibles est une douleur orofaciale. Les

30 patients atteints par une pathologie associée à une douleur orofaciale englobe les patients atteints par ladite pathologie et souffrant effectivement d'une douleur orofaciale ainsi que les patients atteints par ladite pathologie mais qui ne présentent pas, ou qui n'ont pas encore développé, une douleur orofaciale. On entend par « douleur orofaciale » une douleur affectant une zone du visage, du cou, de la bouche ou de la sphère ORL en particulier de l'oreille ou du

nez. Il peut s'agir d'une douleur affectant un muscle ou une articulation faciale, d'une douleur dentaire ou encore d'une névralgie faciale.

De préférence, la pathologie associée à une douleur orofaciale est choisie dans le groupe constitué parmi une hypersensibilité dentaire (dents sensibles), une pulpite, une odontalgie, une douleur des muscles maxillaires ou des articulations temporo-mandibulaires, une névralgie, de préférence idiopathique, du nerf trijumeau, une céphalée, et une brûlure idiopathique de la langue et de la bouche.

Typiquement, les utilisations selon l'invention sont des utilisations *ex vivo*, plus exactement *in vitro*. En particulier, ces utilisations ne couvrent pas des utilisations dans lesquelles l'anticorps serait en interaction directe avec le corps humain ou un animal. Les utilisations selon l'invention comprennent généralement la détection ou la quantification de Nav 1.9 dans un échantillon biologique du patient à l'aide d'un anticorps selon l'invention. En d'autres termes, les utilisations selon l'invention comprennent généralement la mise en contact d'un échantillon biologique du patient dans des conditions permettant la formation d'un complexe immun entre Nav 1.9, potentiellement présent dans l'échantillon, et l'anticorps dirigé contre Nav 1.9, ce par quoi l'expression de Nav 1.9 dans l'échantillon biologique peut être détectée et/ou quantifiée. Comme cela sera exprimé ci-après, l'échantillon biologique peut subir un certain nombre de traitement avant la mise en contact avec l'anticorps dirigé contre Nav 1.9.

La présente invention concerne également une méthode *in vitro* de diagnostic ou de pronostic d'une pathologie associée à une douleur orofaciale ou entérique chez un individu, ladite méthode comprenant la détection de Nav 1.9, à l'aide d'un anticorps selon l'invention, dans un échantillon biologique de l'individu. Plus précisément, cette méthode peut comprendre les étapes consistant à:

- (a) détecter ou quantifier l'expression de Nav1.9 dans un échantillon biologique du patient avec un anticorps selon l'invention, et
- (b) comparer l'expression de Nav1.9 obtenue à l'étape (a) avec l'expression de Nav1.9 détectée ou quantifiée dans un ou plusieurs échantillons biologiques provenant d'un ou plusieurs sujets contrôles.

Dans certains modes de réalisations, le ou les sujets contrôles sont des individus souffrant de la pathologie que l'on souhaite diagnostiquer chez le patient. Dans ce mode de réalisation, on peut considérer que le patient souffre, ou est très susceptible de souffrir à court terme, de ladite pathologie si l'expression de Nav 1.9 déterminée à l'étape (a) est au moins égale à celle détectée dans les échantillons des sujets contrôles. Si l'expression de Nav 1.9 déterminée à l'étape (a) est significativement inférieure à celle détectée pour les sujets contrôles, le

diagnostic est négatif. Enfin, si l'expression de Nav 1.9 déterminée à l'étape (a) n'est que très légèrement inférieure à celle déterminée pour les sujets contrôles, le patient peut être diagnostiqué comme un patient à risque, c'est-à-dire un patient susceptible de développer la pathologie considérée.

- 5 Dans d'autres modes de réalisation, le ou les sujets contrôles correspondent à des patients sains, c'est-à-dire à des individus qui ne souffrent pas de la pathologie associée à une douleur orofaciale ou entérique. Dans ces modes de réalisations, le patient est diagnostiqué comme souffrant de la maladie considérée, ou susceptible d'en souffrir (c'est-à-dire diagnostiqué comme un patient à risque), si son échantillon biologique présente une expression de Nav 1.9
10 supérieure à celle du ou des échantillons provenant des patients sains. En revanche, si l'expression de Nav 1.9 déterminée à l'étape (a) est inférieure ou égale à celle des échantillons provenant des patients contrôles (sains), alors le diagnostic peut être considéré comme négatif. On peut considérer que l'échantillon du patient est positif si l'échantillon présente une expression pour Nav 1.9 au moins 10% supérieure, de préférence au moins 20%
15 voire au moins 50% supérieure à celle du ou des échantillons des patients sains.

La détection ou la quantification de Nav 1.9 dans les échantillons biologiques du ou des sujets contrôles peuvent être concomitantes à celles effectuées pour l'échantillon du patient ou provenir de données collectées antérieurement et disponibles, par exemple, sur une base de données.

- 20 L'invention a également pour objet l'utilisation d'un anticorps selon l'invention pour évaluer l'efficacité d'un médicament dans le traitement d'une pathologie associée à une douleur orofaciale ou entérique telle que décrite précédemment. Afin de suivre l'efficacité d'un traitement thérapeutique d'une maladie cutanée inflammatoire chez un patient, on peut mettre en œuvre les étapes suivantes:

- 25 (a) détecter ou quantifier l'expression de Nav1.9, à l'aide de l'anticorps selon l'invention, dans un échantillon biologique du patient avant traitement,
(b) détecter ou quantifier l'expression de Nav1.9, à l'aide de l'anticorps selon l'invention, dans un échantillon biologique du patient après traitement, et
(c) comparer l'expression de Nav1.9 de l'étape (a) avec l'expression de Nav1.9 de l'étape
30 (b).

L'efficacité du traitement est déterminée en comparant les expressions de Nav 1.9 dans les échantillons (a) et (b). Si l'expression de Nav 1.9 est plus faible dans l'échantillon de l'étape (b) que dans l'échantillon de l'étape (a), ceci signifie que le traitement est efficace. S'il y a une augmentation de l'expression de Nav 1.9, on peut considérer que le traitement est peu

actif ou inactif selon l'importance de la variation observée. Dans certains modes réalisations, on considère que le traitement a un effet thérapeutique sur la pathologie considérée s'il implique une diminution d'expression de Nav 1.9 d'au moins 10%, de préférence d'au moins 20%, de manière encore plus préférée d'au moins 50%.

- 5 De préférence, dans les deux étapes (a) et (b), on utilise le même anticorps selon l'invention. Un autre objet selon l'invention est l'utilisation d'un anticorps selon l'invention pour le suivi *in vitro* de l'évolution d'une pathologie associée à une douleur entérique ou orofaciale telle que décrite ci-avant. Pour ce faire, les étapes suivantes peuvent être réalisées :

- 10 (a) détecter ou quantifier l'expression de Nav1.9, à l'aide d'un anticorps selon l'invention, dans un premier échantillon biologique du patient à un temps t1,
(b) détecter ou quantifier l'expression de Nav1.9, à l'aide d'un anticorps selon l'invention, dans un second échantillon biologique du patient, à un temps t2 postérieur au temps t1, et
(c) comparer l'expression de Nav1.9 de l'étape (b) avec l'expression de Nav1.9 de l'étape
15 (a).

De préférence, dans les deux étapes (a) et (b), on utilise le même anticorps selon l'invention.

La comparaison des taux d'expressions de Nav 1.9 dans l'étape (c) est un critère permettant de déterminer la progression ou le stade de la maladie considérée. Il est ainsi possible de déterminer si la maladie est en régression, stationnaire ou s'aggrave.

- 20 Si l'échantillon de l'étape (b) présente un taux d'expression de Nav 1.9 inférieur au taux d'expression mesuré à l'étape (a), il peut être conclu que la pathologie considérée est en régression. A l'inverse, si l'échantillon de l'étape (b) présente un taux d'expression de Nav 1.9 supérieur à celui mesuré à la première étape, la pathologie est en voie de progression. Le temps t2 peut être postérieur d'au moins 1 mois, de préférence d'au moins 6 mois, voire d'au
25 moins 1 an au temps t1.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un anticorps selon l'invention pour générer des données et/ou des informations utiles pour diagnostiquer, et/ou pour prédire et/ou pour suivre l'évolution d'une pathologie associée à une douleur orofaciale ou entérique, ces méthodes pouvant contenir l'une quelconque des combinaisons d'étapes ci-dessus décrites.

- 30 Dans l'ensemble des méthodes et utilisations ci-dessus décrites, la pathologie associée à une douleur orofaciale de préférence une hypersensibilité dentaire ou une névralgie, ou à une douleur entérique de préférence le syndrome de l'intestin irritable ou la maladie de Crohn

Dans les utilisations et méthodes ci-dessus décrites, la nature des échantillons biologiques varie en fonction de la finalité recherchée, et de la pathologie à diagnostiquer ou à

pronostiquer. De manière générale, l'échantillon biologique est un échantillon tissulaire comprenant des ganglions et/ou des fibres nerveuses sensibles innervant une région de l'appareil digestif, en particulier le côlon, l'intestin grêle ou le rectum, ou une zone orofaciale.

- 5 Lorsque l'anticorps est utilisé pour détecter et quantifier hNav 1.9 en recherche médicale ou en médecine légale, l'échantillon biologique peut être tout type d'échantillon tissulaire adapté, prélevé post-mortem

Lorsque l'anticorps est utilisé à des fins diagnostiques chez un patient, l'échantillon biologique peut correspondre à une biopsie ou à un résidu opératoire.

- 10 Lorsque la pathologie à diagnostiquer ou à pronostiquer est une pathologie associée à une douleur entérique, l'échantillon biologique peut être une biopsie prélevée au cours d'une endoscopie ou d'une coloscopie ou encore au cours d'une chirurgie viscérale. A titre alternatif, il peut s'agir d'un résidu opératoire obtenu au cours d'une résection intestinale ou rectale. Pour le diagnostic ou le pronostic d'une pathologie associée à une douleur entérique,
- 15 l'échantillon biologique est de préférence un échantillon de ganglions myentériques, un échantillon de ganglions du plexus sous-muqueux ou encore un échantillon comprenant des fibres nerveuses du plexus myentérique ou du plexus sous-muqueux. De préférence, l'échantillon biologique est un échantillon de côlon ou d'intestin grêle.

- Lorsque la pathologie à diagnostiquer ou à pronostiquer est une pathologie associée à une
- 20 douleur orofaciale, l'échantillon biologique peut être un échantillon de pulpe dentaire. Cet échantillon de pulpe dentaire peut être obtenu après extraction d'une dent définitive ou d'une dent de lait ou par prélèvement à l'aide d'un moyen adapté au travers de la couronne dentaire. L'échantillon de pulpe dentaire peut être radiculaire ou coronaire. A titre alternatif, il peut s'agir également d'une biopsie d'un tissu comprenant des fibres nerveuses du nerf trijumeau.

- 25 Comme cela est détaillé ci-après, l'échantillon biologique peut subir un ou plusieurs traitements afin de permettre la détection ou la quantification de Nav 1.9 par un anticorps selon l'invention.

- Les méthodes et utilisations selon l'invention sont généralement basées sur une étape de mise en contact de l'échantillon biologique avec l'anticorps selon l'invention dans des conditions
- 30 permettant la formation d'un complexe immunitaire entre Nav 1.9, potentiellement présent dans l'échantillon, et ledit anticorps. La détection et/ou la quantification de Nav 1.9 dans l'échantillon est en général réalisée via la formation et éventuellement la détection du complexe immunitaire.

La détection et/ou la quantification de Nav 1.9 à l'aide d'un anticorps selon l'invention peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, par exemple par immunodosage, par western blot ou par immunomarquage, en particulier par immunohistochimie ou par immunocytochimie. A titre d'exemple de techniques d'immuno-

5 dosages, on peut citer les dosages radio-immunologiques (RIA), les dosages immunologiques « magnétiques » (magnetic immunoassay MIA), les tests ELISA en sandwich ou par compétition. La quantification et/ou la détection de Nav 1.9 dans un échantillon biologique peut être basée sur une étape séparative par immuno-chromatographie dans laquelle l'anticorps selon l'invention est utilisé en tant que ligand d'affinité. Il peut être envisagé de

10 détecter ou de quantifier Nav 1.9 dans un échantillon biologique par immunoprécipitation ou encore par résonance plasmonique de surface dans laquelle l'anticorps selon l'invention est immobilisé à la surface du senseur.

Les techniques préférées sont l'immunohistochimie et le western blot. Il s'agit là de techniques bien connues de l'homme du métier. Des exemples de mises en œuvre sont

15 présentés dans la partie expérimentale de la présente demande.

Brièvement, la technique par western blot comprend la préparation d'un extrait protéique à partir de l'échantillon biologique, la mise en œuvre d'une étape d'électrophorèse généralement en conditions dénaturantes (gel SDS-PAGE), le transfert des protéines ayant migré sur une membrane puis une étape d'immunodétection à l'aide d'un anticorps primaire

20 (anticorps anti-Nav 1.9 selon l'invention) puis une étape de révélation du complexe anticorps-Nav 1.9 éventuellement formé.

Pour la détection ou la quantification de Nav 1.9 dans un échantillon biologique par western blot, on préfère utiliser un anticorps selon l'invention dirigé contre un épitope inclus dans un peptide de séquence SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°3.

La technique d'immunohistochimie comprend la préparation d'une coupe tissulaire qui peut être soit cryofixée, soit fixée chimiquement. La coupe de tissu peut être en option réhydratée avant la mise en contact avec l'anticorps selon l'invention. L'échantillon est incubé avec l'anticorps selon l'invention dans des conditions favorables à la formation du complexe anticorps-Nav 1.9. La détection du complexe peut être effectuée directement si l'anticorps est

25 couplé à un moyen de détection ou, le cas échéant à l'aide d'un anticorps secondaire. En général, le moyen de détection couplé à l'anticorps selon l'invention, ou le cas échéant, à l'anticorps secondaire est une molécule fluorescente. La détection des complexes Nav 1.9-anticorps selon l'invention peut alors être effectuée par microscopie à fluorescence. Dans certains modes de réalisation, afin de visualiser les structures cellulaires au niveau desquelles

30

une expression de Nav 1.9 est attendue, un co-marquage avec un second anticorps peut être effectué. A titre d'exemple, afin de visualiser les fibres nerveuses sensibles susceptibles d'exprimer Nav 1.9 au niveau de la pulpe dentaire, un co-marquage avec un anticorps anti-périphérine peut être réalisé. Les anticorps selon l'invention sont particulièrement adaptés à une utilisation en immunomarquage.

Les anticorps dirigés contre un épitope inclus dans les séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°3 sont utilisables sur tissus cryofixés ou chimiquement fixés. Ces anticorps sont également utilisables en immunocytochimie.

Les anticorps selon l'invention dirigés contre un épitope contenu dans SEQ ID N°2 sont de préférence utilisés pour détecter ou quantifier Nav 1.9 sur des coupes tissulaires cryofixées.

Dans certains modes de réalisations, les méthodes et utilisations selon l'invention peuvent comprendre la détection d'un marqueur supplémentaire à Nav 1.9 ou l'évaluation d'un symptôme particulier de la pathologie considérée.

Enfin, l'invention concerne également un kit pour le diagnostic d'une pathologie associée à une douleur orofaciale ou entérique comprenant un anticorps selon l'invention et en option un moyen de détection dudit anticorps. Le kit diagnostique peut également comprendre un ou plusieurs objets supplémentaires, par exemple, une notice explicative pour la mise en œuvre du test diagnostique, un ou plusieurs réactifs pour la préparation de l'échantillon biologique, ou encore un ou plusieurs moyens utiles pour le prélèvement de l'échantillon biologique.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un kit comprenant un anticorps selon l'invention et en option un moyen de détection dudit anticorps dans le diagnostic *in vitro* d'une pathologie associée à une douleur orofaciale ou entérique.

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent. Ces exemples doivent être considérés comme illustratifs et en aucun cas comme limitant la portée de l'invention.

Exemples

Exemple 1 : préparation d'anticorps polyclonaux

Anticorps Rbaa4 et Rbaa6 :

Deux lapins ont été, chacun, immunisés avec un mélange peptidique contenant les 2 peptides (SEQ ID N°1 et SEQ ID N°3) couplés à KLH (calendrier ci-après).

Contrôle de la réponse immunitaire par ELISA. Purification sur colonne d'affinité (couplage Hi-trap NHS) des prélèvements J63 et J77.

L'anticorps Rbαa4 a été isolé par un procédé de purification comprenant une étape de chromatographie d'affinité dans laquelle le ligand immobilisé était le peptide de SEQ ID N°1.

- 5 L'anticorps Rbαa6 a été isolé par un procédé de purification comprenant une étape de chromatographie d'affinité dans laquelle le ligand immobilisé était le peptide de SEQ ID N°3.

Anticorps 3881.2 et 3881.1 :

- Deux lapins ont été, chacun, immunisés avec un mélange peptidique contenant les 2 peptides (SEQ ID N°2 et SEQ ID N°4) couplés à KLH (calendrier ci-après). Purification sur colonne d'affinité (AF-Amino TOYOPEARL/MBS) des prélèvements J28. L'anticorps 3881.1 a été isolé par un procédé de purification comprenant une étape de chromatographie d'affinité dans laquelle le ligand immobilisé était le peptide de SEQ ID N°2. L'anticorps 3881.2 a été isolé par un procédé de purification comprenant une étape de chromatographie d'affinité dans laquelle le ligand immobilisé était le peptide de SEQ ID N°4.

Référence anticorps	Peptide antigénique	Nbre d'immunisations	Jour de prélèvement/purification
Rbaa4	N-terminale de Nav1.9 (SEQ ID N°1)	5 (J0, J14, J28, J42, J56)	J63-J77
3881.1	Peptide de la boucle intracellulaire I-II (SEQ ID N°2)	4 (J0, J7, J10, J18)	J28
3881.2	Peptide de la boucle intracellulaire II-III (SEQ ID N°4)	4 (J0, J7, J10, J18)	J28
Rbaa6	Peptide de la boucle intracellulaire II-III (SEQ ID N°3)	5 (J0, J14, J28, J42, J56)	J63-J77

Exemple 2 : Caractérisations des anticorps

20 1. Immunofluorescence sur systèmes hétérologues

Un système d'expression hétérologue a été utilisé pour sélectionner les anticorps et tester leur spécificité. Des cellules HEK-293 ont été transfectées : 1) avec un plasmide contenant la séquence nucléique codant pour la sous-unité alpha Nav1.9 humaine étiquetée *myc* à son extrémité C-terminale ou 2) avec les séquences codant pour Nav 1.5 ou Nav 1.7 humains

(hNav1.5 et hNav1.7). Ces derniers n'étant pas étiquetés, ils ont été co-transfectés avec un plasmide codant pour l'expression de la GFP. .

24 h après transfection, les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde 2% (PAF), perméabilisées au triton 0,1% puis incubées avec l'anticorps anti-hNav 1.9 à tester.

5 L'expression de hNav1.9 est testée par un co-marquage avec un anticorps monoclonal anti-myc alors que l'expression de hNav1.5 et hNav1.7 est testée avec un anticorps PanNav, reconnaissant tous les canaux sodiques.

- Résultats

Le marquage du système hétérologue exprimant hNav1.9-myc avec l'anticorps Rbaa4 ou
10 l'anticorps Rbaa6 est co-localisé avec le marquage anti-myc. On ne distingue aucun marquage par Rbaa4 et Rbaa6 des cellules non-transfectées, ce qui montre que ces anticorps ne se lient pas à une protéine endogène. A titre d'illustration, la Figure 1 montre les résultats de co-marquage avec l'anticorps monoclonal anti-Myc et l'anticorps polyclonal Raab4 pour
15 des cellules recombinantes exprimant hNav1.9-Myc (Figure 1A) et des cellules non-recombinantes (Figure 1B). Des marquages identiques ont été obtenus pour l'anticorps Rbaa6 (données non montrées).

Il apparait également que les anticorps Rbaa4 et Rbaa6 ne marquent pas les systèmes hétérologues exprimant hNav 1.5 et hNav 1.7, dont le pourcentage d'identité est de 56 % et 55 % avec hNav1.9. Ceci montre que Rbaa4 et Rbaa6 n'ont pas de réactivité croisée vis-à-vis
20 de hNav 1.5 et hNav1.7. A cet égard, la Figure 2 montre les résultats d'immunomarquage avec l'anticorps Rbaa4 des cellules HEK exprimant hNav1.5, identifiées par la GFP (Figure 2A) et des cellules HEK exprimant hNav1.7, identifiées par la GFP (Figure 2B). Alors que le signal émis par la GFP est clairement visible, le marquage avec Rbaa4 des cellules est très faible voire inexistant. Le marquage avec un anticorps monoclonal anti-PanNav a confirmé
25 une expression correcte de hNav 1.5 ou hNav 1.7 par les cellules HEK. Des marquages identiques ont été obtenus pour l'anticorps Rbaa6 (données non montrées). Les anticorps Rbaa4 et Rbaa6 reconnaissent donc de manière spécifique hNav 1.9 et ne présentent pas de réactivité croisée avec hNav 1.5 et hNav 1.7.

Aucun marquage n'est détecté avec l'anticorps 3888.1 que ce soit avec les cellules
30 transfectées ou non-transfectées. Cette absence de détection résulte du procédé de fixation chimique qui doit induire une altération de la conformation de la région de hNav 1.9 reconnue par cet anticorps. En revanche, cet anticorps marque de manière très efficace et sensible des tissus cryofixés (voir ci-après).

L'anticorps dirigé contre le peptide SEQ ID N°4 est incapable de détecter hNav.1.9, quel que soit le système cellulaire et le tissu analysé.

2. Western Blot

- 5 Des analyses par western blot d'extraits protéiques issus de la lyse des cellules HEK transfectées avec hNav1.9 ont été réalisés afin de conforter la spécificité de détection des anticorps Rbaa4 et Rbaa6.

- Résultats

- 10 Les anticorps Rbaa4 et Rbaa6 reconnaissent une bande ayant un poids moléculaire aux alentours de 250 kDa (**Figure 2**). Cette bande est aussi présente lors de la détection avec l'anticorps anti-myc. De plus, cette bande n'est pas détectée pour l'extrait provenant de cellules non transfectées (contrôle négatif). Le poids moléculaire de la bande spécifique est un peu plus haut que le poids moléculaire attendu pour hNav 1.9-Myc (210 kDa environ). Cette différence de poids moléculaire est certainement attribuable à des modifications post-
- 15 traductionnelles, en particulier à des glycosylations. Une expérience de déglycosylation sur le lysat protéique a été réalisée et a mis en évidence une diminution de l'intensité de la bande à 250 kDa, ce qui conforte cette hypothèse.

Exemple 3 : Immunohistochimie sur tissus humains

- 20 Des essais d'immunomarquage de ganglions myentériques, de pulpe dentaire et de ganglions trijumeaux humains ont été réalisés à l'aide des anticorps Rbaa4, Rbaa6 et 3881.1.

▪ Préparation des échantillons biologiques

- Ganglions myentériques : Les résidus opératoires de côlon (parties saines) sont récupérés rapidement après prélèvement, placés sur glace dans du Krebs carbogéné, additionné de
- 25 bloqueurs de la contraction musculaire (atropine, 2 μ M et nicardipine, 6 μ M), avant dissection.

Composition du Krebs carbogéné (en mM) : 118 NaCl, 4.8 KCl, 1 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 1.2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂ et 11 Glucose, équilibré à pH 7.4 avec 95% O₂-5% CO₂.

- La dissection consiste à enlever la muqueuse, la sous-muqueuse et à réduire l'épaisseur du
- 30 tissu en enlevant un peu de muscle (longitudinal et circulaire) de manière à rendre accessible les neurones des ganglions myentériques (Osorio et Delmas, 2010, Nature Protocols, 6(1) : 15-27).

Le tissu est ensuite incubé 1h dans du PBS 4% sucrose (masse/volume) à 4°C, puis 12h dans du PBS 20% sucrose, toujours à 4°C.

Composition du PBS (en mM) : 140 NaCl, 10 mM PO₄ Buffer (NaHPO₄ et NaH₂PO₄), 3 mM KCl, pH 7.2.

- 5 Pulpe dentaire : Après prélèvement, la dent est conservée dans du PBS à 4°C. La pulpe dentaire est extraite de l'émail, puis incubé 1h dans du PBS 4% sucrose (masse/volume) à 4°C, puis 12h dans du PBS 20% sucrose, toujours à 4°C.

- Ganglion trijumeau : Après prélèvement (12-24h post-mortem), les ganglions sont incubés 2h dans du PBS 4% sucrose (masse/volume) à 4°C, puis 12h dans du PBS 20% sucrose, toujours
10 à 4°C.

Enfin, les tissus sont inclus dans de l'OCT et congelés dans de l'isopentane rafraîchi avec de la carboglace. Les blocs sont stockés au -80°C.

Les coupes transverses de 15-30 µm sont faites au cryostat, montées sur des lames Superfrost, séchées (1h sous Sorbonne) puis stockées au -80°C jusqu'à utilisation.

- 15 A la sortie du congélateur, les lames sont séchées 30 min sous une sorbonne.

Les tissus peuvent ensuite être traités de deux manières différentes selon que l'anticorps primaire nécessite un tissu cryofixé ou fixé chimiquement. Ils sont donc :

- Réhydratées avec du PBS pendant 1h : tissu cryofixé
- ou fixés avec du paraformaldéhyde (PAF) 4% (volume/volume) pendant 10 min, puis
20 rincées 4 x 10 min dans du PBS : tissu fixé chimiquement

▪ Protocole d'immunomarquage

- Les coupes sont incubées 1h30 à température ambiante dans un milieu de saturation : PBS + 3% (masse/volume) BSA + 0.3% (volume/volume) Triton X-100. Les anticorps primaires
25 sont ajoutés au milieu de saturation pour une incubation de 12 h à 4°C en chambre humide. Les coupes sont ensuite rincées 4 fois 15 min dans du PBS avant 45 min d'incubation à à température ambiante avec les anticorps secondaires dans du PBS + 3% (masse/volume) BSA en chambre humide. Enfin, les coupes sont rincées 4 fois 15 min dans du PBS avant d'être montées dans un milieu de montage (Mowiol ou Prolong Gold)

- 30 Des co-marquages avec un anticorps anti-HuC/D ou anti-NF200 pour les ganglions myentériques, avec un anticorps anti-périphérine pour la pulpe dentaire ou avec un anticorps anti-NF200 pour le ganglion trijumeau ont été réalisés afin de visualiser les corps cellulaires ou les fibres des neurones.

▪ Résultats

Les anticorps Rbaa4 et Rbaa6 donnent un marquage intéressant de Nav 1.9 pour les différents tissus humains testés, qu'ils soient chimiquement ou cryo-fixés. Les anticorps Rbaa4 et Rbaa6 sont ainsi capables de détecter la présence de Nav 1.9 au niveau de coupes transversales de côlon, de pulpe dentaire, et de ganglions trijumeaux après fixation chimique ou cryofixation. Des exemples d'immunomarquages (non-exhaustifs) obtenus par les Demandeurs avec les anticorps Rbaa4 et Rbaa6 sont illustrés par les Figures 4 et 5 (côlon), 7 et 8 (pulpe dentaire) et 11 (ganglion trijumeau).

L'anticorps 3881.1 marque de manière très efficace et sensible les tissus cryo-fixés, en particulier de pulpe dentaire (Figures 9 et 10) et de plexus myentérique (Figure 6). En revanche, l'anticorps 3881.1 est inefficace sur tissu fixé chimiquement (données non montrées) et donne un marquage faible des ganglions trijumeau.

Le marquage obtenu pour les coupes de côlon révèle que certains neurones du plexus myentérique expriment fortement Nav 1.9 (neurones immunopositifs) alors que d'autres sont immunonégatifs. Un tel résultat suggère que Nav 1.9 est exprimé par une sous-population de neurones du plexus myentérique. Aucun marquage des muscles longitudinal et circulaire n'a été détecté, ce qui confirme la spécificité des anticorps selon l'invention.

La pulpe dentaire est innervée par un grand nombre de fibres nerveuses non-myélinisée ou faiblement myélinisée de la branche mandibulaire du nerf trijumeau. Les immunomarquages de la pulpe dentaire coronaire et radiculaire par les anticorps selon l'invention ont montré que Nav 1.9 est essentiellement exprimé au niveau des fibres non-myélinisées et positives à la périphérie. On note également que le marquage de Nav 1.9 n'est pas uniforme, contrairement à ce qui est observé pour la périphérie, ce qui suggère la présence de « cluster » d'expression pour Nav 1.9.

Enfin, l'immunomarquage de coupes de ganglion trijumeau a montré que Nav 1.9 est présent au niveau des corps cellulaires de neurones sensitifs de petite et moyenne taille.

Ces expériences d'immunomarquage démontrent que les anticorps selon l'invention peuvent être utilisés pour la détection de hNav 1.9 au niveau de différents tissus humains par immunohistochimie. Ces expériences suggèrent également l'implication de Nav 1.9 dans la transmission de la douleur orofaciale, en particulière dentaire, et dans des pathologies associées à une douleur entérique.

Tableau de séquences

Référence	Séquence
SEQ ID N°1	Peptide inclus dans l'extrémité N-terminale de hNav1.9 : IAIQKEKKKSKDQTGEV
SEQ ID N°2	Peptide de la boucle intracellulaire I-II ESGKDQPPGSDSDEDC
SEQ ID N°3	Peptide de la boucle intracellulaire II-III QAYELHQENKKPTSQRV
SEQ ID N°4	Peptide de la boucle intracellulaire II-III SNEERNGNLEGEARK

Revendications

1. Anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain caractérisé en ce que ledit anticorps se lie à un épitope inclus dans un peptide de séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3.

5

2. Anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain selon la revendication 1 en ce qu'il est adapté à une utilisation pour la détection ou la quantification de Nav 1.9 dans un échantillon biologique humain.

10 3. Anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain selon la revendication 1 ou 2, ledit anticorps étant un anticorps polyclonal.

4. Anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain selon la revendication 1 ou 2, ledit anticorps étant choisi parmi un anticorps monoclonal, de préférence une immunoglobuline (Ig), un anticorps à simple domaine (sdab), ou une IgNar, un polypeptide comprenant un domaine variable d'un anticorps tel qu'un ScFv, un VH, un V_HH, un V_{NAR}, un Fab, et les versions chimériques ou humanisés de ceux-ci.

5. Anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'il ne se lie pas à Nav 1.5 et Nav 1.7.

6. Anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir d'anticorps ou de cellules exprimant des anticorps provenant d'un animal non-humain immunisé avec un composé antigénique comprenant au moins un peptide de SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3 ou un peptide ayant une séquence qui diffère de SEQ ID N°1, N°2 ou N°3 en vertu d'une, de deux, ou de trois modifications d'acide aminé.

7. Anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il est couplé à un moyen de détection, de préférence choisi parmi une enzyme produisant un signal détectable telle que la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la 3-galactosidase, ou la glucose-6-phosphate déshydrogénase, un chromophore, un composé fluorescent, un composé luminescent, un radionucléide tel que ³²P, ³⁵S ou ¹²⁵I, une particule

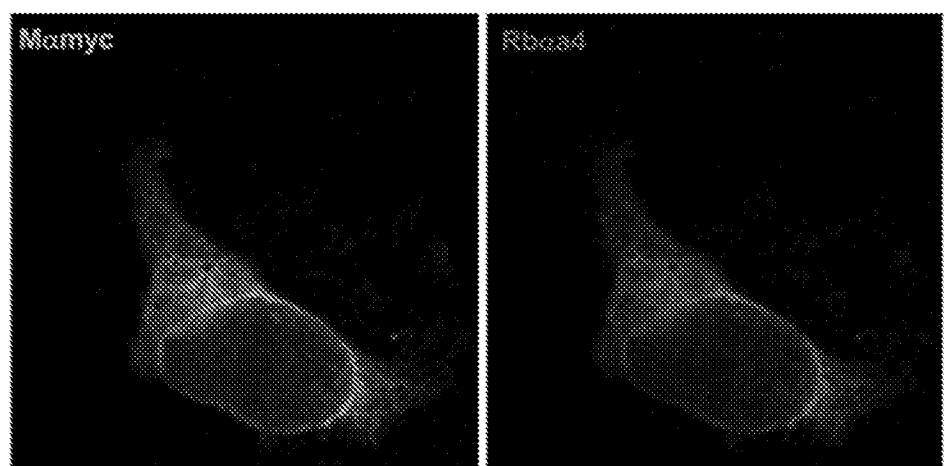
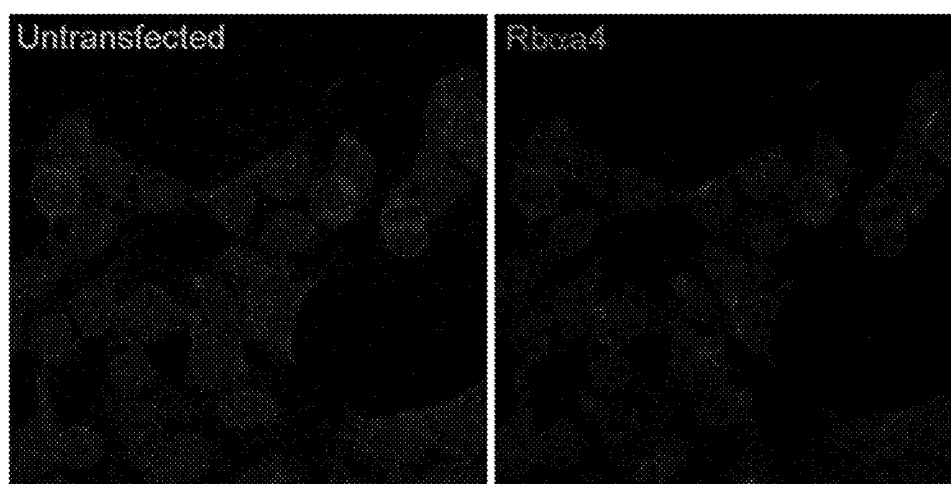
30

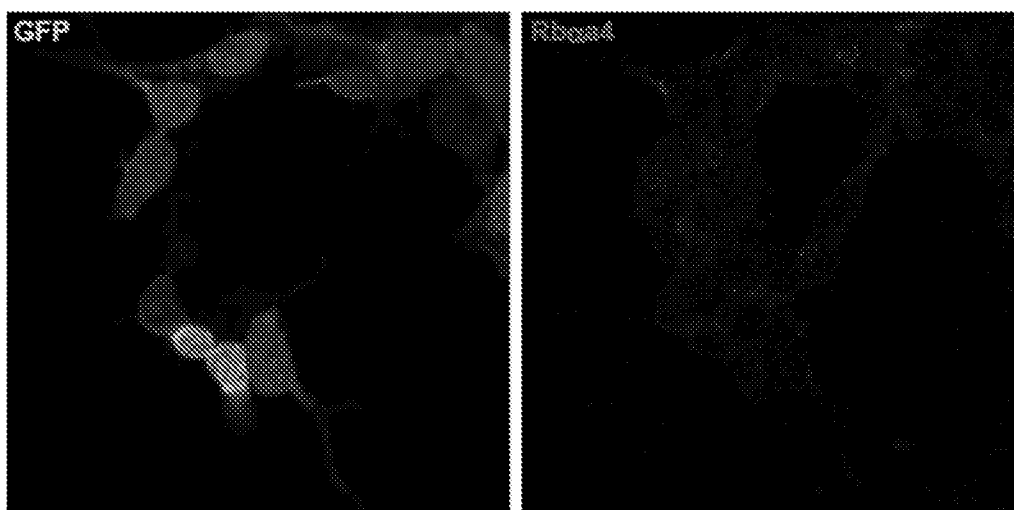
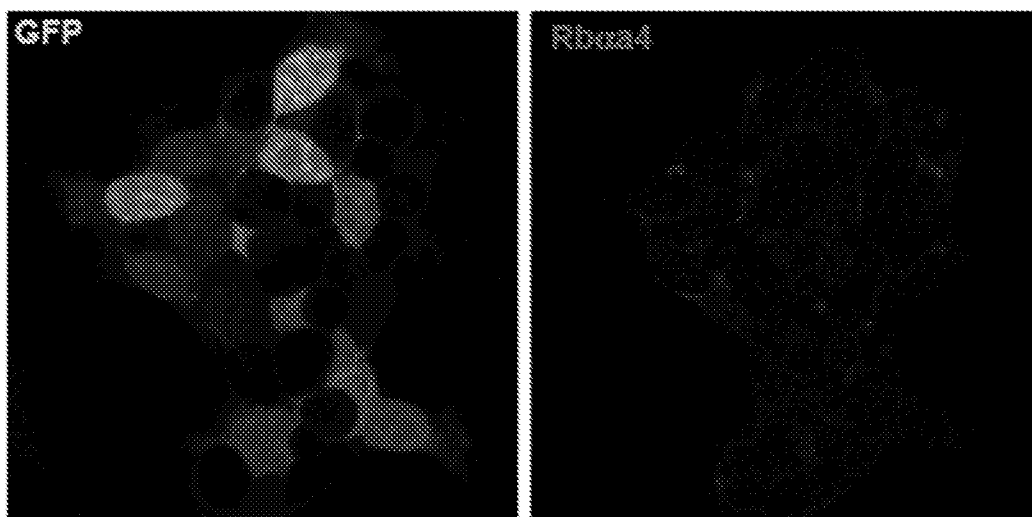
métallique, par exemple une nanoparticule d'or, une biotine, une streptavidine, une avidine, un sucre ou une lectine.

- 5 8. Méthode de préparation d'un anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain comprenant une étape d'immunisation d'un animal non-humain avec un composé antigénique comprenant au moins un peptide de SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3 ou un peptide ayant une séquence qui diffère de SEQ ID N°1, N°2 ou N°3 en vertu d'une, de deux, ou de trois modifications d'acide aminé.
- 10 9. Méthode de préparation d'un anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain selon la revendication 8 dans laquelle le composé antigénique comprend une protéine porteuse couplée à une ou plusieurs copies dudit peptide.
- 15 10. Méthode de préparation selon la revendication 8 ou 9 comprenant, en outre, la récupération de l'anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain à partir du plasma sanguin de l'animal non-humain, après immunisation.
- 20 11. Méthode de préparation selon la revendication 8 caractérisé en ce que l'anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain est produit par un hybridome obtenu à partir d'une cellule exprimant des anticorps, de préférence un lymphocyte B provenant de l'animal non-humain après immunisation.
- 25 12. Anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain susceptible d'être obtenu selon l'une quelconque des revendications 8 à 11.
13. Utilisation d'un anticorps dirigé contre Nav 1.9 tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 7 ou 12 pour la détection ou la quantification de Nav 1.9 dans un échantillon biologique humain.
- 30 14. Utilisation d'un anticorps selon la revendication 12 caractérisé en ce que l'échantillon est un résidu chirurgical, une biopsie ou un prélèvement post-mortem.
15. Utilisation d'un anticorps dirigé contre Nav 1.9 humain tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 7 ou 12 pour le diagnostic, le pronostic et/ou la prédiction

in vitro d'une pathologie, de préférence à caractère inflammatoire, associée à une douleur entérique ou à une douleur orofaciale.

- 5 16. Utilisation selon la revendication 15 dans laquelle la pathologie associée à une douleur entérique est choisie parmi le groupe constitué par un syndrome de l'intestin irritable et une maladie inflammatoire chronique intestinale telle que la maladie de Crohn et une colite ulcéreuse.
- 10 17. Utilisation selon la revendication 15 dans laquelle la pathologie associée à une douleur orofaciale est choisie parmi le groupe constitué par une hypersensibilité dentaire (dents sensibles), une pulpite, une odontalgie, une douleur des muscles maxillaires ou des articulations temporo-mandibulaires, une névralgie, de préférence idiopathique, une céphalée, du nerf trijumeau et une brûlure idiopathique de la langue et de la bouche.
- 15 18. Utilisation selon l'une quelconques des revendications 13 à 17 dans laquelle l'anticorps dirigé contre Nav 1.9 est utilisé pour détecter ou quantifier Nav 1.9 dans un échantillon biologique choisi parmi un échantillon comprenant des ganglions et/ou des fibres nerveuses sensibles innervant une région de l'appareil digestif ou une zone orofaciale.
- 20 19. Utilisation selon la revendication 18 dans laquelle l'échantillon tissulaire est choisi parmi un échantillon de pulpe dentaire, un échantillon de ganglions myentériques, un échantillon de ganglions du plexus sous-muqueux, un échantillon comprenant des fibres nerveuses du plexus myentérique ou sous-muqueux.
- 25 20. Utilisation selon l'une des revendications 13-19 dans laquelle Nav 1.9 est détecté ou quantifié par immunodosage, par western blot ou par immunomarquage, de préférence par immunohistochimie.
- 30 21. Kit pour le diagnostic d'une pathologie, de préférence à caractère inflammatoire, provoquant une douleur viscérale ou une douleur orofaciale, comprenant au moins un anticorps dirigé contre Nav 1.9 tel que défini dans l'une des revendications 1 à 7 ou 12 et en option un moyen de détection dudit anticorps.

**Figure 1A****Figure 1B**

**Figure 2A****Figure 2B**

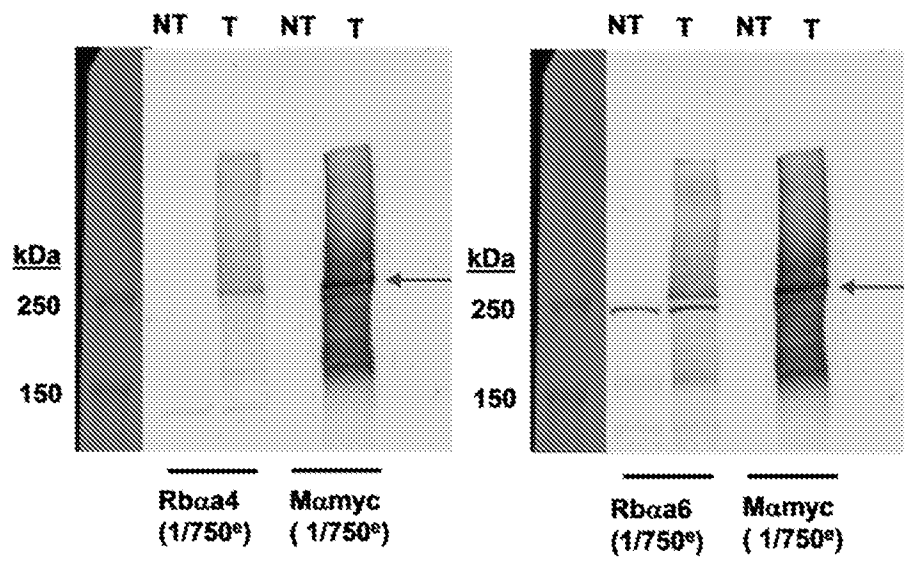


Figure 3

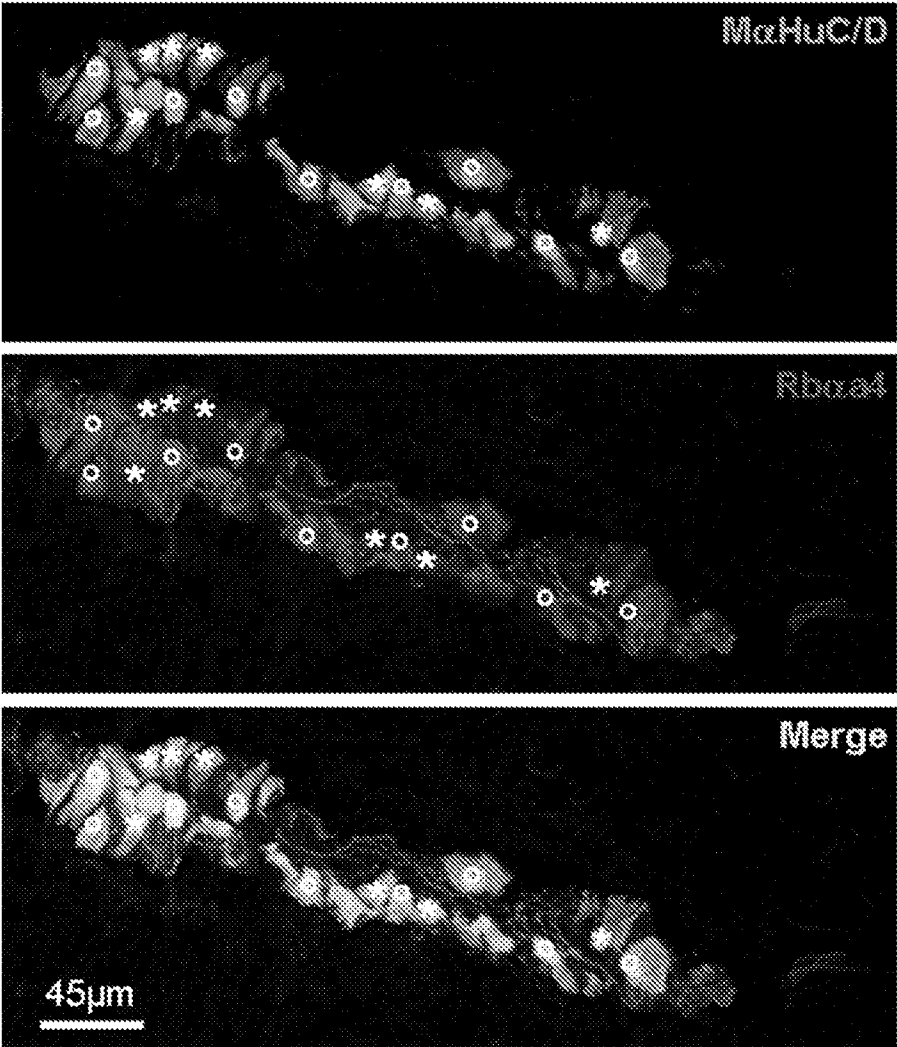


Figure 4

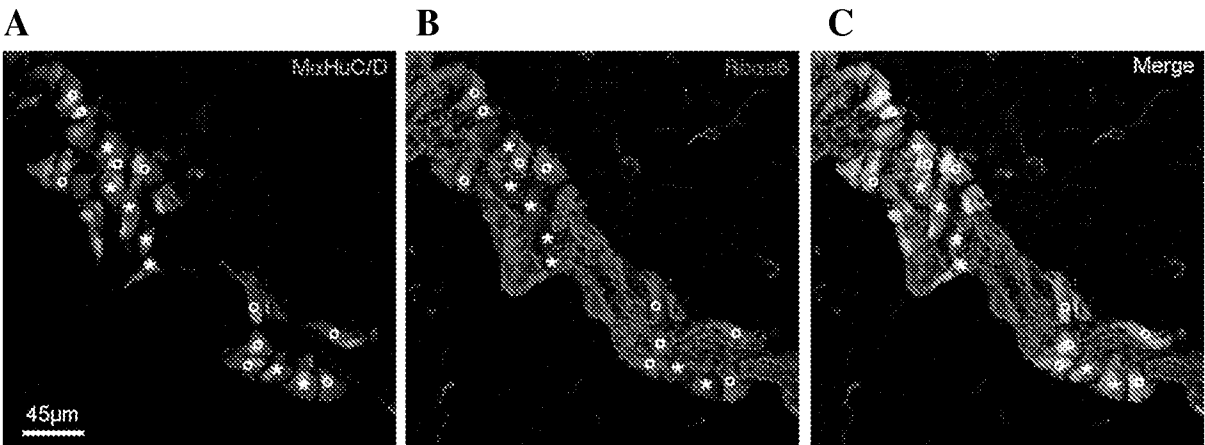


Figure 5

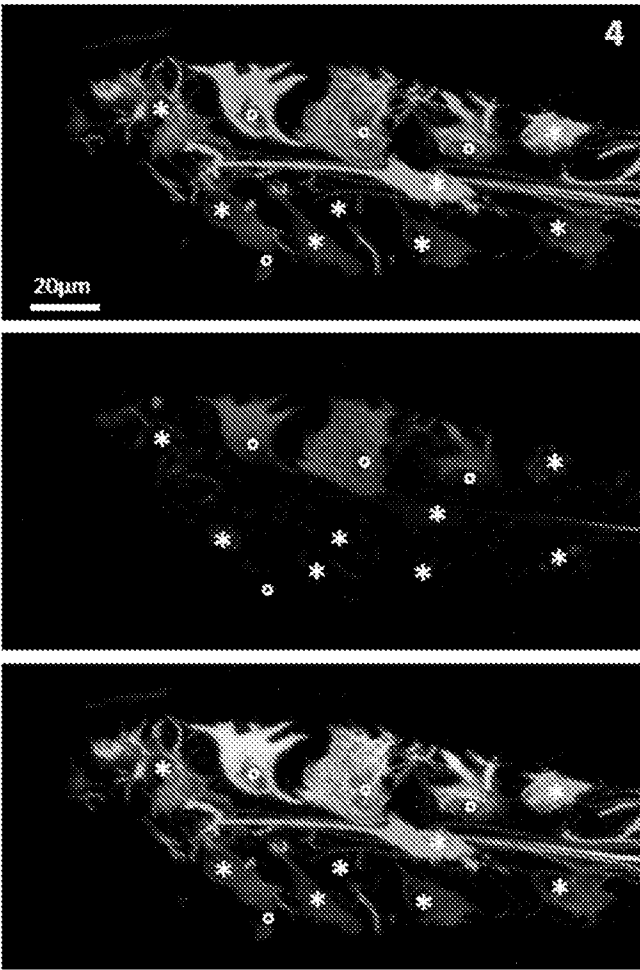


Figure 6

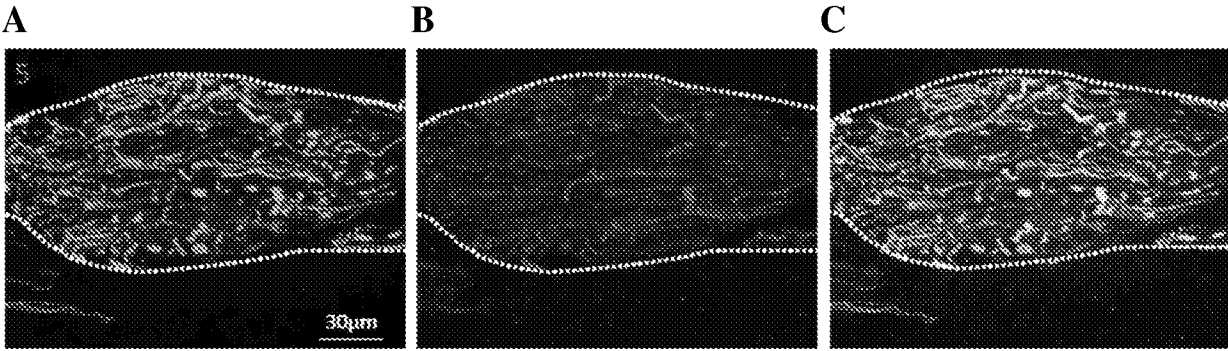


Figure 7

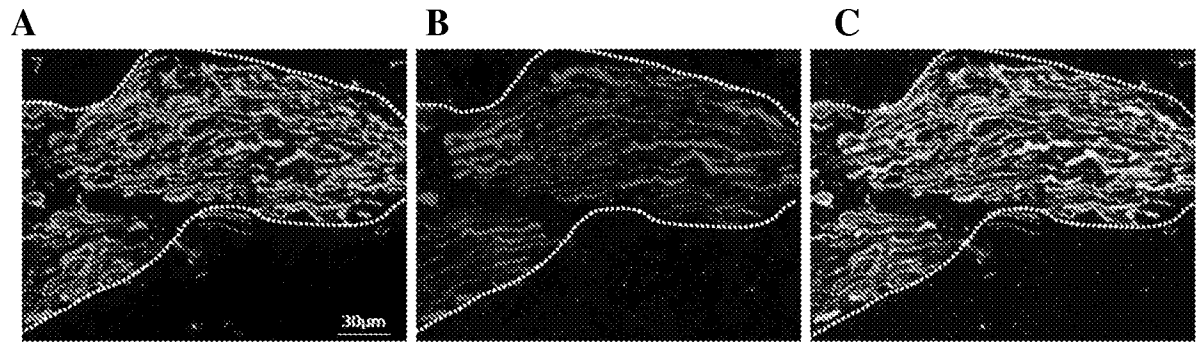


Figure 8

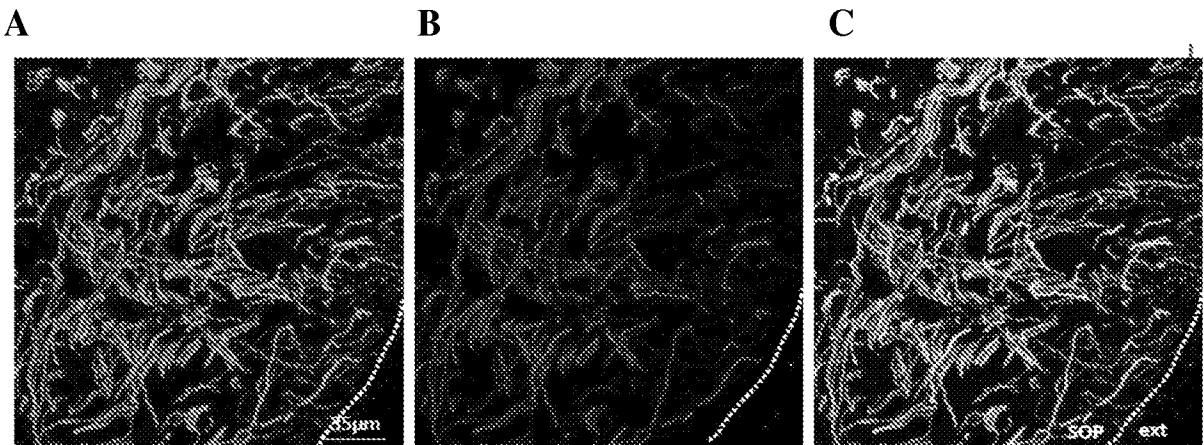


Figure 9

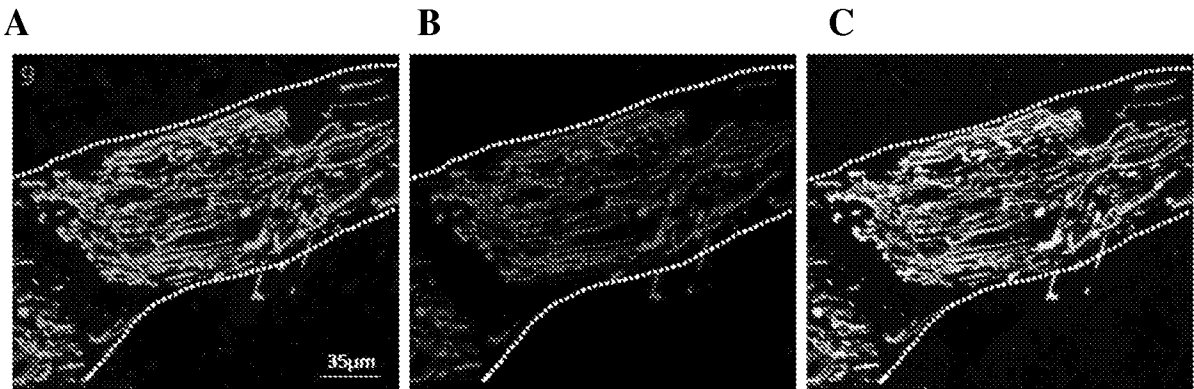


Figure 10

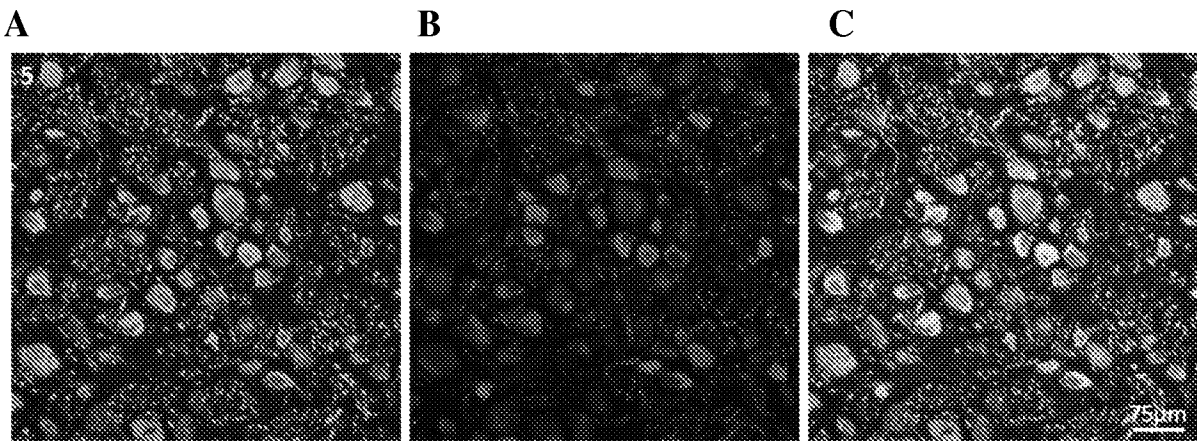


Figure 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2014/051643

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 G01N33/58 G01N33/68
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STRICKLAND IAIN T ET AL: "Changes in the expression of Nav1.7, Nav1.8 and Nav1.9 in a distinct population of dorsal root ganglia innervating the rat knee joint in a model of chronic inflammatory joint pain.", EUROPEAN JOURNAL OF PAIN JUL 2008, vol. 12, no. 5, July 2008 (2008-07), pages 564-572, XP002720204, LONDON, ENGLAND ISSN: 1532-2149 page 566, left-hand column, paragraph 3 page 571, left-hand column, last paragraph ----- -/-	1-21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 October 2014

Date of mailing of the international search report

05/11/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, Katell

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2014/051643

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PADILLA ET AL: "Expression and localization of the Nav1.9 sodium channel in enteric neurons and in trigeminal sensory endings: Implication for intestinal reflex function and orofacial pain", MOLECULAR AND CELLULAR NEUROSCIENCES, vol. 35, no. 1, 26 April 2007 (2007-04-26) , pages 138-152, XP022056623, SAN DIEGO, US ISSN: 1044-7431, DOI: 10.1016/J.MCN.2007.02.008 page 139, left-hand column, line penultimate - right-hand column, line 3 -----	1-21
A	LOLIGNIER ET AL: "Nav1.9 channel contributes to mechanical and heat pain hypersensitivity induced by subacute and chronic inflammation", PLOS ONE, vol. 6, no. 8, E23083, 1 August 2011 (2011-08-01), pages 1-11, XP002698323, abstract -----	1-21
A	WO 2007/023298 A2 (ISIS INNOVATION [GB]; LEI MING [GB]; GAO BIN [GB]) 1 March 2007 (2007-03-01) page 2 - page 3 -----	1-21
A	FRANK H YU ET AL: "Overview of the voltage-gated sodium channel family", GENOME BIOLOGY (ONLINE), BIOMED CENTRAL LTD, GB, vol. 4, no. 3, 1 January 2003 (2003-01-01) , page 207, XP002415109, ISSN: 1465-6914 the whole document -----	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2014/051643

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007023298	A2	01-03-2007	NONE

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2014/051643

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07K16/28 G01N33/58 G01N33/68 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07K A61K G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	STRICKLAND IAIN T ET AL: "Changes in the expression of Nav1.7, Nav1.8 and Nav1.9 in a distinct population of dorsal root ganglia innervating the rat knee joint in a model of chronic inflammatory joint pain.", EUROPEAN JOURNAL OF PAIN JUL 2008, vol. 12, no. 5, juillet 2008 (2008-07), pages 564-572, XP002720204, LONDON, ENGLAND ISSN: 1532-2149 page 566, colonne de gauche, alinéa 3 page 571, colonne de gauche, dernier alinéa ----- -/--	1-21
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
9 octobre 2014	05/11/2014	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Le Flao, Katell

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	PADILLA ET AL: "Expression and localization of the Nav1.9 sodium channel in enteric neurons and in trigeminal sensory endings: Implication for intestinal reflex function and orofacial pain", MOLECULAR AND CELLULAR NEUROSCIENCES, vol. 35, no. 1, 26 avril 2007 (2007-04-26) , pages 138-152, XP022056623, SAN DIEGO, US ISSN: 1044-7431, DOI: 10.1016/J.MCN.2007.02.008 page 139, colonne de gauche, ligne penultimate - colonne de droite, ligne 3 -----	1-21
A	LOLIGNIER ET AL: "Nav1.9 channel contributes to mechanical and heat pain hypersensitivity induced by subacute and chronic inflammation", PLOS ONE, vol. 6, no. 8, E23083, 1 août 2011 (2011-08-01), pages 1-11, XP002698323, abrégé -----	1-21
A	WO 2007/023298 A2 (ISIS INNOVATION [GB]; LEI MING [GB]; GAO BIN [GB]) 1 mars 2007 (2007-03-01) page 2 - page 3 -----	1-21
A	FRANK H YU ET AL: "Overview of the voltage-gated sodium channel family", GENOME BIOLOGY (ONLINE), BIOMED CENTRAL LTD, GB, vol. 4, no. 3, 1 janvier 2003 (2003-01-01) , page 207, XP002415109, ISSN: 1465-6914 le document en entier -----	1-21

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2014/051643

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2007023298	A2	01-03-2007	AUCUN
